

EDSON KUATELELA CASSINELA

**ANÁLISES CITOGENÉTICAS EM *Melipona paraensis* (HYMENOPTERA:
APIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2014**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

C345a
2014 Cassinela, Edson Kuatelela, 1986-
Análises citogenética em *Melipona paraensis* (Hymenopter:
Apidae) / Edson Kuatelela Cassinela. - Viçosa, MG, 2014.
ix, 33 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Tânia Maria Fernandes Salomão.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Abelha sem ferrão - Citogenética. 2. Heterocromatina.
3. Cromossomos. 4. Ciclo celular. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação Mestrado
em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22 ed. 595.799

EDSON KUATELELA CASSINELA

**ANÁLISES CITOGENÉTICAS EM *Melipona paraensis*
(HYMENOPTERA: APIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 27 de Janeiro de 2014.

Denilce Menese Lopes

Dihego de Oliveira Azevedo

Tânia Maria Fernandes Salomão
(Orientadora)

Quão grande é o meu DEUS!

Ao meu DEUS!

Aos meus queridos pais

Domingos Cassinda e Sofia Cassinda

DEDICÓ

AGRADECIMENTOS

Mas uma etapa cumprida e objetivo alcançado com bastante dedicação e determinação, obstáculos e grandes barreiras ultrapassadas porque minhas forças vêm do Senhor. Obrigado DEUS, pelo dom de vida, proteção e saúde, por me guiar e proteger durante esta árdua luta que só se vence com AMOR e na sua presença, “SENHOR só tu me fortaleces.”

Não existem palavras para expressar toda minha alegria e satisfação por este almejado objetivo hoje alcançado querem agradecer a Universidade Federal de Viçosa em particular ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pelo acolhimento, proporcionado formação acadêmica e pessoal.

Ao professor José Eduardo Serrão (Coordenador do programa), a Beth (Secretária).

À minha orientadora, professora Tânia Maria Fernandes Salomão, pela orientação, apoio e incentivo, pela competência e confiança, que com todo cuidado e atenção transmitiu-me conhecimentos e por ter contribuído para a minha formação.

À minha coorientadora, professora Denilce Meneses Lopes pelos conhecimentos transmitidos, ideias, acessória e acompanhamento durante todos os períodos do mestrado, nas difíceis preparações de seminários e aulas, pelo grande e valioso contributo na minha formação científica e profissional, por acompanhar, contribuir diretamente em todas etapas do presente trabalho.

À todos os professores e colaboradores do programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural em geral e em particular aos professores José Lino Neto, João Marcos de Araújo, Sérgio Luís Pinto da Matta, Gustavo Ferreira Martins, Lucio António de Oliveira Campos, Clóvis Andrade Neves, a professora Sílvia das Graças Pompolo e [Mara Garcia Tavares](#).

Aos amigos, colegas e companheiros do Laboratório de Biologia Molecular de Insetos, Riudo Paiva por ter contribuído significativamente neste trabalho, Renata Barbosa a a responsável pelo laboratório, Kenner, Henrique, Rodrigo e Denise.

Aos amigos do Laboratório de Ultraestrutura Celular, Dihego, Douglas Debora, Polly, Monteiro, Glenda, Hellen, Maria e Mary.

Aos colegas com quem partilhei momentos de tristeza e alegria como o Marcelo, Wagner e Jamile.

Aos meus pais Domingos Cassinela e Sofia Cassinela, não existem palavras para expressar meu humilde agradecimento por tudo que vocês fazem por mim, eu Amo vocês, muito obrigado por estarem comigo nessa luta, apesar do vasto oceano atlântico que nos separa estamos sempre juntos.

Aos meus irmãos: Ernestina, Elsa, Ildo, Azda, Aires Chimy, Aires Tydes, Ester, Osvaldo e Yolanda.

À minha namorada Thais Adão pelo companheirismo e por estar comigo em todos os momentos.

Aos meus sobrinhos, Oriz, Jairo, Jazi, Juzi, Jack, Marcio, Yola, Diogines, Luis, Alcione, Ramy, Nil, Marcela, Toth, Bino, Nela, Ariane e Samurai.

Ao Walter e Katia por me indicarem a Universidade Federal de Viçosa e cuidarem de mim.

Ao grande amigo (mais que um irmão) Aristides Ngolo e ao Haitiano Wesly Jeune.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e concretização deste grande sonho.

Venho também agradecer a este bondoso e acolhedor povo brasileiro, tem sido uma grande e inesquecível experiência a cada segundo, cada minuto, hora e dia passado aqui neste lindo pais tropical, recheado de tantas belezas naturais.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de fomento.

MUITO OBRIGADO!

BIOGRAFIA

Edson Kuatelela Cassinela, filho de Domingos Cassinela e de Sofia Cassinela nasceu aos 19 de Agosto de 1986, na Cidade do Huambo, Município do Huambo, província do Huambo-Angola. Fez seus estudos primários na escola número 102 no Bairro S. João Huambo-Angola 1991-1996. Em 1997 ingressou no ensino secundário na Escola Ndala-Kandumbo na mesma cidade, terminando no ano seguinte. De 1999 a 2000 fez e terminou com aproveitamento positivo o ensino de base na escola Comandante Bula na mesma cidade. Em 2001 ingressou no Instituto Médio de Saúde tendo concluído com sucesso e lhe foi atribuído o título de Enfermeiro Geral em fevereiro de 2005. No mesmo ano ingressou a Universidade Agostinho Neto no curso de Biologia, tendo concluído em Outubro de 2009. Em fevereiro de 2012, sob orientação da professora Tânia Maria Fernandes Salomão, iniciou o curso de Mestrado em Biologia Celular e Estrutural, na Universidade Federal de Viçosa. Em 2013 com o intuito de agregar conhecimento na área de Gestão iniciou a pós-graduação *Latu sensu* em Gestão Empresarial e Ambiental na mesma Universidade.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1.INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1.Características gerais da ordem Hymenoptera	1
1.2. Abelhas sem ferrão.....	1
1.3. Estudos citogenéticos em meliponíneos.....	3
1.4. Heterocromatina	5
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	7
3. OBJETIVO.....	14
ARTIGO.....	15
RESUMO	16
ABSTRAT.....	17
4. INTRODUÇÃO.....	18
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
5.1. Material biológico.....	20
5.2. Análise citogenética.....	20
6. RESULTADOS.....	22
6.1. Número e morfologia dos cromossomos.....	22
7. DISCUSSÃO.....	23
8. CONCLUSÃO.....	25
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
10. LEGENDA DAS FIGURAS.....	30
11. DOCUMENTOS SUPLEMENTARES.....	31

RESUMO

CASSINELA, Edson Kuatelela, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2014. **ANÁLISES CITOGENÉTICAS EM *Melipona paraensis* (HYMENOPTERA: APIDAE)**. Orientadora: Tânia Maria Fernandes Salomão.

Técnicas citogenéticas são ferramentas muito úteis nos estudos de caracterização e diferenciação de espécies. Amostras de *Melipona paraensis* foram coletadas em Altamira no estado do Pará e utilizadas para descrever o cariótipo da espécie, determinar o conteúdo de heterocromatina, sua localização e composição de bases da cromatina, utilizando técnicas de coloração convencional, banda C e os fluorocromos CMA₃/DA/DAPI. Este é o primeiro estudo de citogenética com a abelha sem ferrão *M. paraensis*. A coloração convencional revelou que esta espécie tem um número de cromossomos de $2n=18$. A técnica de Banda C mostrou alto conteúdo de heterocromatina que está distribuída em todo cromossomo. O alto conteúdo de heterocromatina posiciona *M. paraensis* no Grupo II que inclui as espécies de *Melipona* com alto conteúdo de heterocromatina. O fluorocromo DAPI marcou fortemente a região de heterocromatina indicando que estas regiões devem ser ricas em pares de base AT. O fluorocromo CMA₃ marcou as extremidades dos cromossomos que correspondem à eucromatina. Esta região mais fortemente marcada com fluorocromo CMA₃ pode indicar ser esta, a região organizadora do nucléolo. FISH evidenciou marcações mais claras e brilhantes que foram observadas em regiões específicas dos cromossomos. Estas marcações podem estar indicando a posição do centrômero nos cromossomos avaliados, resultado este, relatado pela primeira vez em *Melipona* de alto conteúdo de heterocromatina.

ABSTRACT

CASSINELA, Edson Kuatelela, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, January 2014. **CYTOGENETIC ANALYSIS IN *Melipona paraensis* (HYMENOPTERA: APIDAE)**. Advisor: Tania Maria Fernandes Solomão.

Cytogenetic techniques are very useful tools in studies of characterization and differentiation of species. *Melipona paraensis* samples were collected at Altamira in Para State and used to describe the karyotype of the species, determine the heterochromatin content, its location and base composition of chromatin, using conventional staining techniques, C-band and fluorochromes CMA3/DA / DAPI. This is the first study of cytogenetics with the stingless bee *M. paraensis*. Conventional staining revealed that this species has a chromosome number of $2n=18$. The technique of Band C showed high content of heterochromatin that is distributed throughout the chromosome. The high content of heterochromatin positioning *M. paraensis* in Group II includes species of *Melipona* with high heterochromatin content. The DAPI fluorochrome strongly marked the region of heterochromatin indicating that these regions should be rich in AT base pairs. The CMA3 fluorochrome marked the ends of chromosomes that correspond to euchromatin. This region most heavily labeled with fluorochrome CMA3 may indicate that this is the nucleolus organizer regions. FISH showed clearer and brighter markings that were observed in specific regions of chromosomes. These markings may be indicating the position of centromere on chromosomes evaluated, this result, is the first reported in *Melipona* of high heterochromatin content.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Características gerais da ordem Hymenoptera

A ordem Hymenoptera que compreende as vespas, abelhas e formigas é considerada um dos maiores grupos dentre os insetos. Cerca de 115.000 espécies (HANSON & GAULD, 1995), distribuídas em 99 famílias taxonômicas (GOULET & HUBER, 1993) já foram descritas. Essa ordem tem sido bastante estudada por apresentar características notáveis como a ampla diversidade de padrão de vida e evolução de formas sociais (CROZIER, 1977).

As abelhas pertencem à superfamília Apoídea, subgrupo Anthophila. O representante mais conhecido é a [Apis mellifera](#), oriunda do [Velho Mundo](#), que é criada em larga escala para a produção de [mel](#), [cera](#) e [própolis](#). A maioria das plantas são polinizadas por insetos, dentre estes insetos as abelhas constituem o grupo mais importante em número e diversidade sendo consideradas como principais grupos de polinizadores de plantas floríferas em diversos ecossistemas. O número e a diversidade das espécies de abelhas que atuam como vetor de pólen é muito vasto (BAWA, 1990; NEFF & SIMPSON, 1993). Além disso, tem sua ação reconhecida na perpetuação de espécies silvestres, contribuindo significativamente, para a manutenção do equilíbrio ecológico (LASSALE & GAULD, 1993). A importância destes insetos não se resume ao transporte de grãos de pólen de uma flor para outra, pois, consistem em vetores bastante ativos e que, muitas vezes promovem o cruzamento entre plantas separadas por grandes distâncias. Este fenômeno ocorre quando elas carregam o pólen de uma região para outra, o que garante a manutenção do ciclo de reprodução sexuada das plantas e, conseqüentemente, favorece a disponibilidade de alimento para outros animais (CAMPOS 1998).

1.2. Abelhas sem ferrão

A tribo Meliponini, abelhas sociais brasileiras, popularmente chamadas de abelhas indígenas sem ferrão é consideradas importantes polinizadores de plantas nativas. Os meliponíneos encontram-se distribuídos amplamente pelo

mundo, sendo encontrado nas regiões tropicais e também nas regiões subtropicais do hemisfério sul, nas Américas do Sul e Central, Ásia, Ilhas do Pacífico, Austrália, Nova Guiné e África (CAMARGO & PEDRO, 1992; MICHENER, 2000). O Brasil é um dos principais locais onde essas abelhas são encontradas (VELTHUIS, 1997; CAMARGO & PEDRO, 1992).

Os meliponíneos são de grande importância ecológica e econômica, no entanto, estudos recentes mostram que algumas espécies deste grupo vem sofrendo redução populacional devido a vários fatores. Esta redução da diversidade de abelhas pode ser acompanhada pela perda de muitas espécies de plantas visto que um grande número dessas plantas, em diversas regiões, dependem delas para polinização (LA SALLE & GAULD, 1993).

Uma das causas da redução populacional dos meliponíneos é a destruição dos ambientes naturais. Estas abelhas formam um grupo isolado e muito especializado, cujos indivíduos dependem das características climáticas e florísticas de suas regiões de origem, sendo consideradas muito frágeis quando expostas à destruição de seus habitats. Além disso, a maioria das espécies nidifica em ocos de árvores que estão sendo destruídos durante os desmatamentos de grandes ou pequenas áreas florísticas. Outro grande problema é o uso indiscriminado de agrotóxicos e a ação predatória de melieiros, que derrubam árvores mais velhas, para obtenção de mel, as quais são as mais prováveis de serem utilizadas pelas abelhas para nidificação deixando o ninho aberto, desprotegido e exposto à ação de predadores (CAMPOS, 1998; KERR *et al.*, 1999). Além disso, a transformação de grande área de florestas em pequenas capoeiras pode representar limitações ao desenvolvimento das populações, como diminuição de locais para nidificação e redução na disponibilidade de alimentos (VIANA & MELO, 1987).

Essa tribo inclui 50 gêneros e mais de 400 espécies conhecidas. *Melipona* é o que apresenta maior número de espécies conhecidas. Dentro deste gênero, estão incluídas aproximadamente 70 espécies, com ocorrência em toda a região neotropical, distribuindo-se desde o México até Misiones, na

Argentina, apresentando uma maior diversificação na bacia amazônica (SILVEIRA *et al.*, 2002; CAMARGO & PEDRO, 2007).

A tribo Meliponini é considerado o mais diverso dentre as abelhas eussociais (SAKAGAMI, 1982) apresentando, espécies com variações quanto ao aspecto comportamental, sistema de comunicação, estratégias de forrageamento, densidades populacionais, arquiteturas de ninhos (MICHENER, 1974) bem como no padrão da distribuição de heterocromatina nas espécies do gênero *Melipona*, observado com base em análises citogenéticas (ROCHA & POMPOLO, 1998).

1.3. Estudos citogenéticos em meliponíneos

É possível, com base em análises citogenéticas caracterizar morfológica e quantitativamente os cromossomos de uma determinada espécie. Os primeiros estudos citogenéticos em Meliponini, incluindo algumas espécies do gênero *Melipona*, iniciaram com KERR (1948), o precursor da citogenética de toda a tribo.

Depois de KERR (1948), outros estudos citogenéticos com meliponíneos foram realizados (KERR & ARAUJO, 1957; KERR 1969; 1972; KERR & SILVEIRA, 1972; TARELHO, 1973). Todos estes estudos consistiam basicamente na determinação do número cromossômico utilizando técnicas de esmagamento.

Estudos realizados posteriormente (COSTA *et al.*, 1992; HOSHIBA & IMAI 1993; POMPOLO & CAMPOS 1995; BRITO *et al.* 1997, 2003; BRITO-RIBON *et al.* 1998, 1999, 2005; ROCHA & POMPOLO 1998; CAIXEIRO & POMPOLO 1999; MAMPUMBU & POMPOLO 2000) utilizaram um tratamento prévio do material (gônadas ou gânglios cerebrais) em solução de colchicina e citrato de sódio, o que possibilitou um acúmulo de metáfases. Posteriormente, esse material era dissociado e fixado numa lâmina em soluções com diferentes concentrações de ácido acético, etanol e água. Essa metodologia ou técnica de secagem ao ar tem se mostrado mais eficiente na diferenciação dos

cromossomos e foi desenvolvida por IMAI *et al.* (1988).

Dentre os estudos citogenéticos realizados com meliponíneos encontram-se aqueles onde o gênero *Melipona* foi avaliado. Desde 1948 até os dias de hoje já foram estudados cerca de dezenove espécies deste gênero sendo que para dezoito dessas espécies o lote haplóide ou valor de n foi igual a 9 (macho) e $2n=18$ (fêmea): *Melipona marginata*, *Melipona quadrifasciata* (KERR, 1948), *Melipona rufiventris*, *Melipona interrupta*, *Melipona schencki* (KERR, 1952), *Melipona bicolor* (KERR, 1952; ROCHA e POMPOLO, 1998), *Melipona compressipes* (KERR, 1969), *Melipona subnitida* (KERR, 1972), *Melipona scutellaris* (ALMEIDA, 1981), *Melipona favosa* (HOSHIBA, 1988), *Melipona asilvae*, *Melipona seminigra fuscopilosa*, *Melipona capixaba*, *Melipona captiosa* (ROCHA e POMPOLO, 1998), *Melipona crinita* (ROCHA e colaboradores, 2002), *Melipona mandacaia* (ROCHA e colaboradores, 2003), *Melipona mondury* (LOPES *et al.*, 2006) e *Melipona orbigny* (ROCHA, comunicação pessoal). *Melipona quinquefasciata*, no entanto, apresenta um número cromossômico variável: $2n=19$ a 22 (fêmea) e de $n=9$ a 13 (macho) ROCHA (2002) constatou que a variação foi devida à presença de cromossomos B. Essa espécie já havia sido estudada citogeneticamente por KERR (1972) e POMPOLO (1994), porém, ambos não relataram a presença desse tipo de cromossomo nas amostras analisadas. Em 2008, LOPES e colaboradores detectaram cromossomo B em uma colônia de *Melipona rufiventris*. No entanto, KERR (1952) ao analisar a mesma espécie, não detectou esse tipo de cromossomo nas amostras avaliadas. Apesar da variação observada, pode-se considerar que em *Melipona* o número cromossômico é uma característica conservada do gênero uma vez que os estudos iniciados em 1948 até os de datas mais recentes mostraram que a maioria das espécies deste gênero apresenta número cromossômico igual a $2n = 18$.

Uma das contribuições significativas dos estudos citogenéticos em meliponíneos é o melhor entendimento de questões relacionadas ao papel da heterocromatina no genoma destas abelhas. SUMNER (2003) enfatiza que a

heterocromatina é, talvez, uma das questões menos compreendida quando se trata de estudo dos cromossomos. Embora diferentes conceitos tenham sido atribuídos a heterocromatina, o desenvolvimento de novos métodos de análise tem permitido avaliações mais detalhadas contribuindo, assim, para aumentar a compreensão desta importante característica dos cromossomos.

1.4. Heterocromatina

A heterocromatina parece ter um papel imprescindível na determinação da estrutura tridimensional do núcleo interfásico afetando direta ou indiretamente a expressão gênica. Em células germinativas, já foi detectado que a heterocromatina afeta basicamente o pareamento e a segregação de cromossomos bem como eventos de recombinação (JOHN 1988).

IMAI (1991) e IMAI *et al.* (1986; 1988; 1994) propuseram com base em dados de mamíferos, formigas e vespas, uma hipótese na tentativa de explicar evolução do cariótipo das espécies. A hipótese prediz que após eventos de fissão cêntrica, ocorreria adição de heterocromatina na região quebrada, esta região corresponde à região telomérica, recuperando, assim, a região do telômero. Esta hipótese é reforçada pela evidência de acúmulo de heterocromatina encontrada em um dos braços nos cromossomos de diversas espécies de formigas que apresentam elevado número de cromossomos. Isto foi observado, também, em outro grupo da ordem Hymenoptera (POMPOLO & CAMPOS 1995, HOSHIBA & IMAI 1993). Quanto às possíveis funções da heterocromatina, também se propõe que pode ter papel importante na proteção da eucromatina contra ataque de vírus, agentes mutagênicos e clastogênicos. Esta função se deve à posição da heterocromatina no núcleo, formando uma camada dispersa na face periférica deste, protegendo a eucromatina situada no interior (HSU 1975).

Nos Hymenoptera, os padrões de distribuição da heterocromatina são associados aos processos de evolução cromossômica. O mecanismo mais aceito para explicar a evolução cariotípica do grupo foi o proposto por IMAI *et al.* (1986) (posteriormente foi revisado por IMAI *et al.*, 1988 e IMAI *et al.*, 1994).

IMAI em seus trabalhos postulou a Teoria da Interação Mínima (TIM) que prevê a ocorrência de modificações nos cariótipos das espécies de Hymenoptera e outros organismos no sentido de minimizar as interações deletérias entre os cromossomos. Além disso, esta teoria prevê que a evolução cariotípica nesses organismos geralmente envolve aumento no número cromossomal devido à fissão cêntrica (IMAI *et al.*, 1986, 1988, 1991). Isto levaria a formação de cromossomos com menor tamanho, reduzindo a probabilidade de rearranjos entre eles. Fusões cêntricas atuariam como um dos mecanismos para eliminar a heterocromatina constitutiva. Porém, segundo a teoria, estas fissões cêntricas gerariam instabilidade telomérica. Como pode ser constatado em diversos estudos citogenéticos com espécies de abelhas do gênero *Melipona* (ROCHA *et al.*, 2003), essa instabilidade poderia levar à incorporação de heterocromatina na extremidade recém criada. Em consequência dessa incorporação, a maior parte dos cromossomos apresentaria um braço cromossômico eucromático e outro heterocromático cuja morfologia cromossômica foi denominada de pseudo-acrocêntrica (A^M). Alguns dados recentes para outros grupos de abelhas (FERNANDES *et al.*, 2013) se mostram incompatíveis com a TIM indicando que para abelhas devem existir outros mecanismos complementares àqueles propostos por Imai.

Na maioria dos casos, as espécies com baixo conteúdo de heterocromatina, apresentam uma distribuição pericentromérica ou no braço curto dos acrocêntricos e nas espécies com alto conteúdo, o percentual de heterocromatina atinge valores superiores e encontra-se distribuída por quase toda extensão do cromossomo (ROCHA e POMPOLO, 1998; ROCHA *et al.*, 2007).

Neste contexto, considerando a importância nos avanços dos estudos citogenéticos com meliponíneos, o presente estudo propõe avaliar *Melipona parasiensis*, espécie de abelha sem ferrão, descrevendo seu cariótipo e determinando o conteúdo e a localização de heterocromatina com base em técnicas de coloração convencional, banda C e uso de fluorocromos.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ALMEIDA, M. G. (1981). Estudo sobre o número de cromossomos e contagem de espermatozoides na abelha *Melipona scutellaris*, Latreille, 1811. *Ciência e Cultura*. 33: 539-542

BAWA, K.S. (1990). Plant-pollinator interactions in tropical rain forests. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*. 21: 399-422.

BRITO-RIBON, R. M.; MIYAZAWA, C. S. & POMPOLO, S. G. (1999). First karyotype characterization of four species of *Partamona* (Friese, 1980) (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) in Mato Grosso State, Brazil. *Cytobios* 100: 19-26.

BRITO-RIBON, R. M.; POMPOLO, S. G.; MARTINS, M. F.; BARROS, E. G. & SAKAMOTO-HOJO, E. T. (1998). Estudo da origem de cromossomos supranumerários em *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae) por meio de hibridação *in situ* fluorescente e coloração com fluorocromos, p. 213-218. *In*: Z. L. P. SIMÕES (ed.), *Anais do 3º Encontro sobre Abelhas*. Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto.

BRITO-RIBON, R. M.; POMPOLO, S.G. Martins, M.F.; MAGALHÕES, M.F.M.; BARROS, E.G. & SAKAMOTO-HOJE, E.T. (2005). Cytogenetic Characterization of Two *Partamona* Species (Hymenoptera, Apinae, Meliponini) by fluorochrome staining and localization of 18S rDNA clusters by FISH. *Cytologia* 70: 373-380.

BRITO, R. M.; A. CAIXEIRO, P. A.; POMPOLO, S. G. & AZEVEDO G. G. (2003). Cytogenetic data of *Partamona peckolti* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) by C banding and fluorochrome staining with DA/CMA3 and DA/DAPI. *Genetics and Molecular Biology* 26: 53-58.

BRITO, R. M.; COSTA, M. A. & POMPOLO, S. G. (1997). Characterization and distribution of supernumerary chromosomes in 23 colonies of *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Brazilian Journal of Genetics 20: 185-188.

BRITO, R.M. (1998). Caracterização citogenética de duas espécies do gênero *Partamona*. Schwaz, 1939 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 97p.

CAIXEIRO, A. P. A. & POMPOLO, S. G. (1999). Caracterização citogenética da heterocromatina constitutiva e sua implicação na evolução do cariótipo do gênero *Plebeia* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). Genetics and Molecular Biology 22 (Supplement 3): 31-32.

CAMARGO, J.M.F. & PEDRO S.R.M. (1992). Systematics, phylogeny and biogeography of the Meliponinae (Hymenoptera: Apidae): a mini review. Apidologie 23:1-32.

CAMARGO, J.M.F. & PEDRO S.M.R. (2007). Meliponini. In: Catalogue of Bee (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region (orgs Moure JS, Urban D, Melo GAR), pp. 272–578. Curitiba, Sociedade Brasileira de Entomologia.

CAMPOS, L.A.O. (1998). *Melipona rufiventris* Lepeletier, 1836. In: MACHADO A.B.M.; FONSECA G.A.B.; MACHADO, R.B.; AGUIAR, L.M. & LINS, L.V. (eds) Livro Vermelho das espécies ameaçadas de extinção da fauna de Minas Gerais. Belo Horizonte. Fundação Biodiversitas. 608p.

COSTA, M. A.; POMPOLO, S. G.; CAMPOS, L. A. O. (1992). Supernumerary chromosomes in *Partamona cupira* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Revista Brasileira de Genética 15: 801-806.

CROZIER, R.H. (1977). Evolutionary genetics of the Hymenoptera. Annual Reviews. Entomology., 22: 263 – 288.

FERNANDES, A.; WERNECK, H.; CAMPOS, L.A.O. & LOPES, D.M. (2013). Evidence of separate karyotype evolutionary pathway in Euglossa orchid bees by conventional and molecular cytogenetic analyses. Anais Academia Brasileira de Ciências. 85:937-944.

GOULET, H. & HUBER, J.T. (1993). Hymenoptera of the world: a guide to identification of families. Agriculture Canada, 668 pp.

HANSON, P.E. & GAULD, I.D. (1995). The Hymenoptera of Costa Rica. Oxford: Oxford University Press, 893 pp.

HOSHIBA, H. (1988). Karyological analysis of a stingless bee, *Melipona favosa* (Apidae, Hymenoptera). Cytologia 53: 153-156.

HOSHIBA, H. & IMAI, H. T. (1993). Chromosome evolution of bees and wasps (Hymenoptera, Apocrita) on the basis of C-banding pattern analyses. Japanese Journal of Entomology 61: 465-492.

HSU, T.C. (1975). A possible function of constitutive heterochromatin: the bodyguard hypothesis. Genetics 79: 137-150.

IMAI, H. T. (1991). Mutability of constitutive heterochromatin (c-bands) during eukaryotic chromosomal evolution and their cytological meaning. Japanese Journal of Genetics 66: 635-661.

IMAI, H.T.; MARUYAMA, T.; GOJOBORI, T.; INOUE, Y. & CROZIER, R.H. (1986). Theoretical bases for karyotype evolution. The minimum-interaction hypothesis. American Naturalist, 128:900-920.□

IMAI, H.T.; TAYLOR, R.W. & CROZIER, R.H. (1994). Experimental bases for the minimum interaction theory. Chromosome evolution in ants of the *Myrmecia pilosula* species complex (Hymenoptera: Formicidae: Myrmecinae). Japanese Journal of Genetics 69:137- 182.

IMAI, H.T.; TAYLOR, R.W.; CROSLAND, M.W. & CROZIER, R.H. (1988). Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. Japanese Journal of Genetics 63, 159-185.

JOHN, B. (1988). Heterochromatin: molecular and structural aspects. (In: the biology of heterochromatin. Cambridge University Press, New York).

KERR, W. E. (1969). Some aspects of the evolution of social bees. Evolutionary Biology. 3:119-175.

KERR, W. E. (1972). Number of chromosomes in some species of bees .J. Kans. Entomological Society. 45: 11-122.

KERR, W. E. & ARAÚJO, V. P. (1957). Contribuição ao estudo citogenético dos Apoidea. Garvia da Orta. 5: 431-433.

KERR, W. E. & SILVEIRA, Z V. (1972). Karyotypic evolution of bees and corresponding taxonomic implications. Evolution 26: 197-202.

KERR, W. E. A (1952) variação do número de cromossomas na evolução dos Hymenoptera. Scientia Genetica 4: 182-190.

KERR, W. E.; CARVALHO, G. A. & NASCIMENTO, V. A. (1996). Abelha Uruçu. Biologia, Manejo e Conservação. Belo Horizonte, Acangaú. 144p.

KERR, W.E. (1948). Estudos sobre o gênero *Melipona*. *Anais da E. S. A. "Luiz de Queiroz"*, 5:182-276.

KERR, W.E.; CARVALHO, G.A. & NASCIMETO, V.M. (1999). The probable consequences of the destruction of brazilian stingless bees: In: PADOCH, C.; AYRES, J.M.; PINEDO-VASQUEZ, M. & HENDERSON, A. (eds) VÁRZEA: diversity, development and conservation of Amazonia's whitewater floodplains. New York Botanical Garden Press, New York, pp. 395-404.

LA SALLE, J. & GAULD, I.D. (1993). Hymenoptera: Their diversity and their impact on the diversity of other organisms. In: LA SALLE J. & GAULD, I.D. (Eds.) Hymenoptera and Biodiversity. Wallingford, UK. 348 p.

LOPES, D.M.; POMPOLO, S.G.; CAMPOS, L.A.O & TAVARES, M.G. (2008). Cytogenetic characterization of *Melipona rufiventris* Lepeletier 1836 and *Melipona mondury* Smith 1863 (Hymenoptera, Apidae) by C banding and fluorochromes staining. *Genetics and Molecular Biology* 31: 49-52.

MAMPUMBU, A. R. & POMPOLO, S. G. (2000). Localização da região organizadora de nucléolo por hibridização *in situ* na abelha sem ferrão *Friesellaschrottkyi* (Friese, 1900) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini), na região de Viçosa, Minas Gerais. *Genetics and Molecular Biology* 23 (Supplement 3): 20.

MICHENER, C.D. (1974). The social behavior of the bees. Harvard University, Press, Cambridge, Massachusetts.

MICHENER, C.D. (2000). The bees of the world. Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press, 913 p.

NEFF, J.L. & SIMPSON, B.B. (1993). Bees, pollination system and plant

diversity. In: LA SALLE, J.; GAULD I.D. (eds) Hymenoptera and Biodiversity. Commonwealth Agricultural Bureaux International, Wallingford, UK pp. 143-167.

POMPOLO, S. G. (1994). Análise dos cariótipos de 19 gêneros de abelhas da subfamília Meliponinae. In: 1º ENCONTRO SOBRE ABELHAS. Ribeirão Preto **Anais...** Ribeirão Preto: Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP, p.143-146.

POMPOLO, S. G. & CAMPOS, L. A. O. (1995). Karyotypes of two species of stingless bees, *Leurotrigona muelleri* and *Leurotrigona pusilla* (Hymenoptera, Meliponinae). Revista Brasileira de Genética 18: 181-184.

ROCHA, M. P. & POMPOLO, S. G. (1998). Karyotypes and heterochromatin variation (C-bands) in *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Genetics and Molecular Biology 21: 41-45.

ROCHA, M. P. (2002). Análises citogenéticas em abelhas do gênero *Melipona* (Hymenoptera, Meliponinae). Dissertação (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) – Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

ROCHA, M. P.; POMPOLO, S. G.; DERGAM, J. A.; FERNANDES, A.; CAMPOS, L. A. O. (2002). DNA characterization and karyotypic evolution in the bee genus *Melipona* (Hymenoptera, Meliponini). **Hereditas**.136: 19-27.

ROCHA, M. P., POMPOLO, S.G. & CAMPOS, L.A.O. (2003). Citogenética da tribo Meliponini (Hymenoptera, Apidae), pp 311-320. In G.A.R. Melo & I. Alves dos Santos (Eds.) Apoidea Neotropica: Homenagem aos 90 Anos de Jesus Santiago Moure., UNESC, Criciúma.

ROCHA, M. P.; POMPOLO, S. G.; FERNANDES, A. & CAMPOS, L. A. O. (2007). *Melipona* – Seis décadas de citogenética. Bioscience Journal, Vol.23,

Supplement 1, pp. 111-117, ISSN 1516- 3725.

SAKAGAMI, S. F. (1982). Stingless bees. In: Social Insects. Academic Press, London. pp 361-423.

SILVEIRA, F.A.; MELO G.A.R. & ALMEIDA, E.A.B. (2002). *Abelhas brasileiras: sistemática e identificação*. Fundação Araucária, Minas Gerais, Belo Horizonte.

SUMNER, A.T. (2003). Chromosomes: organization and function. Blackwell Publishing, London, 287p.

TARELHO, Z. V. S. (1973). Contribuição ao estudo citogenético dos Apoidea. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

VELTHUIS, H.H.W. (1997). Biologia das abelhas sem ferrão. Universidade de São Paulo e Universiteit Utrecht, 377.

VIANA, B.V. & MELO, G.A.R. (1987). Conservação de Abelhas. Informativo Agropecuário 13(149).

3. OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo identificar e descrever, com base em técnicas citogenéticas, o cariótipo da abelha sem ferrão *Melipona paraensis* e determinar o conteúdo bem como a localização de heterocromatina nos cromossomos desta espécie.

ARTIGO

ANÁLISES CITOGENÉTICAS EM *Melipona paraensis* (HYMENOPTERA: APIDAE)

Edson Kuatelela Cassinela^{1,*}, Tânia Maria Fernandes Salomão, Riudo Paiva Ferreira¹, Francisco Plácido Magalhães de Oliveira², Denilce Meneses Lopes¹

1. Laboratório de Biologia Molecular de Insetos - Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, CEP 36570-000, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

2. Universidade Federal do Pará, Altamira, Pará, Brazil

*E-mail: edsonkc@hotmail.com

Análises citogenéticas em *Melipona paraensis* (Hymenoptera: Apidae)

RESUMO: Gânglios cerebrais de larvas pós-defecantes de *Melipona paraensis* foram utilizadas com objetivo de descrever o cariótipo da espécie, determinar o conteúdo de heterocromatina e sua localização com base em técnicas de coloração convencional, banda C e os fluorocromos CMA₃/DA/DAPI. A coloração convencional revelou que esta espécie tem um número de cromossomos de 2n=18. A técnica de Banda C mostrou alto conteúdo de heterocromatina que está distribuída em todo cromossomo, o que posiciona *M. paraensis* no Grupo II que inclui as espécies de *Melipona* com alto conteúdo de heterocromatina. O fluorocromo DAPI marcou fortemente a região de heterocromatina indicando que estas regiões devem ser ricas em pares de base AT. O fluorocromo CMA₃ marcou as extremidades dos cromossomos que correspondem à eucromatina. Esta região mais fortemente marcada com fluorocromo CMA₃ pode indicar ser esta, a região organizadora do nucléolo. A técnica de Hibridação in situ por fluorescência – FISH marcou fortemente regiões específicas dos cromossomos. Estas marcações podem estar indicando a posição do centrômero nos cromossomos avaliados, resultado este, relatado pela primeira vez em *Melipona* de alto conteúdo de heterocromatina. NORs revelou 2 marcações nos núcleos interfásicos.

Palavras-chave: cromossomos metafásicos, heterocromatina e *Melipona*.

Cytogenetic analysis in *Melipona paraensis* (Hymenoptera: Apidae)

Abstract: Post-defecant larvae cerebral ganglion of *Melipona paraensis* were used in order to describe the karyotype of the species, determine the content of

heterochromatin and its location techniques based on conventional staining, C-band and CMA3/DA/DAPI fluorochromes. Conventional staining revealed that this species has a chromosome number of $2n = 18$. The technique of Band C showed high content of heterochromatin that is distributed across chromosome, positioning *M. paraensis* in Group II includes species of *Melipona* with high heterochromatin content. The DAPI fluorochrome strongly marked the region of heterochromatin indicating that these regions should be rich in AT base pairs. The CMA₃ fluorochrome marked the ends of chromosomes that correspond to euchromatin. This region most heavily labeled with fluorochrome CMA₃ may indicate the nucleolus organizer regions . These markings may be indicating the position of the centromere on chromosomes evaluated, this result, first reported in *Melipona* of high heterochromatin content. NORs revealed 2 tags in interphase nuclei.

Keywords: metaphase, chromosome heterochromatin and *Melipona*.

4. INTRODUÇÃO

Estudos citogenéticos com espécies do gênero *Melipona* têm demonstrado diferenças marcantes na distribuição de heterocromatina e na morfologia dos cromossomos destas abelhas. ROCHA & POMPOLO (1998) com base em diferenças na quantidade e distribuição de heterocromatina

dividiram espécies do gênero *Melipona* em dois grupos. No Grupo I foram incluídas as espécies com baixo conteúdo de heterocromatina (menor que 50%) e com distribuição pericentromérica ou no braço curto dos acrocêntricos. No Grupo II ficaram as espécies que possuem mais de 50% de heterocromatina que é distribuída por quase toda extensão dos cromossomos e eucromatina apenas nas extremidades, quando aplicada a técnica de Banda-C (método BSG). Além disso, observaram que algumas espécies apresentavam cromossomos meta, submetá e acrocêntricos. Foram incluídas as espécies *M. marginata*, *M. quadrifasciata*, *M. subnitida*, *M. bicolor*, *M. asilvae* e o complemento A de *M. Quinquefasciata* no grupo I. Outras espécies como *M. crinita*, *M. rufiventris*, *M. compressipes*, *M. scutellaris*, *M. seminigra fuscopilosa*, *M. capixaba* e *M. captiosa* e *M. mondury*, que apresentam distribuição da heterocromatina em toda ou quase toda extensão dos cromossomos, não foi possível definir a morfologia, pois eles apresentam heterocromatina distribuída em quase toda a extensão dos cromossomos, o que dificulta a localização do centrômero e foram incluídas no grupo II. O padrão de distribuição de heterocromatina nos cromossomos de *Melipona* é um dado importante, pois pode junto a outras características dos cromossomos, contribuir para o conhecimento das relações filogenéticas bem como para a compreensão da taxonomia de alguns grupos deste gênero (ROCHA *et. al* 2007).

Melipona paraensis, objeto de estudo deste trabalho, é uma espécie de abelha sem ferrão amplamente distribuída na região Neotropical sendo encontrada nos estados do Amapá, Amazonas, Pará, bem como na Guiana Francesa (Cuyuni-Mazaruni, East Berbice-Corentyne, Potaro-Siparuni e Upper Takutu-Alto Essequibo), Suriname (Marowijne) e Venezuela. Apesar de sua ampla distribuição, estudos citogenéticos envolvendo esta espécie ainda não foram relatados. Este é o primeiro estudo citogenético com *M. paraensis*. Os resultados obtidos neste estudo além de aumentar o conhecimento a cerca desta espécie, poderá contribuir para melhor entendimento das características citogenéticas dos cromossomos do gênero *Melipona*.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Material biológico

Foram analisadas 60 larvas pós-defecantes de *Melipona paraensis*, de 2 colônias coletadas na região de Altamira estado do Pará (Figura 1).

5.2. Análise citogenética

As análises citogenéticas foram realizadas por preparação dos cromossomos metafásicos conforme o protocolo de IMAI *et al.* (1988). As preparações foram feitas a partir de gânglios cerebrais de larvas pós-defecantes de *Melipona paraensis*.

A dissecação dos gânglios cerebrais das larvas foi realizada em solução hipotônica de citrato de sódio 1% com colchicina a 0,005%. Os gânglios permaneceram imersos nesta solução por uma hora e, em seguida, foram transferidos para uma lâmina histológica cuidadosamente preparada e limpa. Posteriormente, o material foi fixado, com uma série de três fixadores. O fixador I (água: etanol: ácido acético, 4:3:3), no qual o material foi dissociado sob um estereomicroscópio; fixador II (etanol: ácido acético, 1:1) foi adicionado, logo após a dissociação e por último adicionou-se algumas gotas do fixador III (100% ácido acético glacial). As lâminas foram secas ao ar e, após 24 horas, foram coradas com solução Giemsa e tampão Sörense (0,06M, pH 6,8) a 4 % por 20 minutos, em temperatura ambiente. As análises de coloração convencional foram realizadas pela observação de 10 metáfases por lâmina.

Na **técnica de Banda C**, segundo SUMNER (1972), utilizou-se o método **BSG** (Hidróxido de Bário/ Salina/Giemsa) que consistiu em submeter o material a uma hidrólise em HCl 0,2M, temperatura ambiente por 1 minuto. Em seguida, foi feita uma rápida lavagem em H₂O destilada. A lâmina foi então imersa em Ba(OH)₂ 5% a 60°C por 13 minutos seguida por uma lavagem em HCl 0,2M por 1 minuto, para interromper a ação do bário e em seguida outra lavagem rápida em H₂O destilada. Posteriormente, o material foi colocado em 2XSSC pH 7,0 a 60°C, por 13 minutos e corado com Giemsa e tampão Sørensen a 8%, por 15 minutos. Aplicando este método é possível evidenciar regiões de DNA altamente repetitivo, regiões dos centrômeros e outras regiões cromossômicas que juntas correspondem à heterocromatina.

Coloração sequencial com fluorocromos (DA/DAPI/CMA₃) foi realizada segundo a metodologia proposta por SCHWEIZER (1980), que consistiu em colocar sobre o material 150µl de solução de distamicina (0,3

mg/ml), cobri-lo com lamínula por 15 minutos, no escuro. Posteriormente retirou-se as lamínulas e as lâminas foram lavadas em água corrente. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em solução tampão McIlvaine por 15 min e secas ao ar. Depois de secas as lâminas foram colocadas em solução DAPI (0,3µg/ml) no escuro por 15 min. Fez-se outra lavagem em água corrente e em seguida as lâminas foram mergulhadas em solução tampão McIlvaine por 15 min. Posteriormente, colocou-se sobre o material 150µl de solução de (Cromomicina A₃ 0,5mg/ml) por 60 min, no escuro. Após esse período, as lâminas foram mergulhadas em solução tampão McIlvaine por 15 minutos. Após secar ao ar, foi realizada a montagem com solução de sacarose saturada e as lâminas foram guardadas em estufa a 37°C no escuro por 15 dias.

Hibridação in situ por fluorescência – FISH foi realizada segundo o procedimento descrito por Pinkel et al. (1986), porém com uma pequena modificação: as lâminas foram tratadas com RNase, inicialmente fez-se uma lavagem nas lâminas com tampão PBS 1 durante 5 min em temperatura ambiente, posteriormente as lâminas foram desidratadas em série alcoólica (70, 80 e 100%) gelado, por 5 min. Em seguida as lâminas foram incubadas em 100 ul de RNase (0,4 RNase/2xSSC) à 37°C por 1h em câmara úmida com água milli-Q. Posteriormente as lâminas foram lavadas 3 x por 5 min em 2xSSC e 5 minutos e PBS 1x. Posteriormente as lâminas foram incubadas por 10 minutos em solução de pepsina 0,0005% (em 10mM HCL) a 37°C, em seguida fez-se uma outra lavagem em PBS 1x durante 5 min a temperatura ambiente, posteriormente as lâminas foram fixadas em formaldeído 1% em PBS1x/50mM MgCl₂ durante 10 min a temperatura ambiente e lavadas em PBS 1x por 5min, fez-se em seguida outra desidratação em série alcoólica (70, 80, 100%) gelada, por 5 min cada por último montou-se as lâminas com 40 ul de Vectashield com DAPI na lâmina e foram cobertas com lamínulas e guardadas no escuro por 3 horas.

As regiões organizadoras dos nucléolos (NORs) foram identificadas impregnação com nitrato de prata (Ag-NOR), tal como descrito por Howell e Black (1980).

O material foi analisado em microscopia de epifluorescência utilizando

primeiramente o filtro WB (330 a 385 nm), para a CMA₃ e em seguida o WU (450 a 480 nm), para o DAPI.

O material foi observado em microscópio Olympus BX60 e as imagens foram analisadas utilizando os programas Image-Pro Plus™ (version 6.3, Media Cybernetics®, 2009) e Adobe PhotoShop CS4 versão 11.0.2.

6. RESULTADOS

6.1. Número e morfologia dos cromossomos

Observou-se com a coloração convencional que todos os indivíduos de *Melipona paraensis* analisados apresentaram o número de cromossomos $2n=18$ (Figura 2 A e B).

A técnica de banda C revelou que *M. paraensis* apresenta um elevado conteúdo de heterocromatina que está distribuída ao longo de todo o cromossomo (Figura 3A).

Ao utilizar coloração sequencial com fluorocromos (DA/DAPI/CMA₃), observou-se que o DAPI marcou fortemente a região de heterocromatina indicando que estas regiões devem ser ricas em pares de base AT (adenina e timina) (Figura 3B e C).

O fluorocromo CMA₃ evidenciou a presença de marcações nas extremidades dos cromossomos que correspondem à eucromatina mostrando o predomínio de bases CG nas mesmas (Figura 3D). A presença de bases CG sugere que estes cromossomos possam conter sítios de sequências de DNA ribossomal normalmente localizados na região organizadora do nucléolo.

Ao utilizar apenas a técnica de FISH com modificações no protocolo, foi possível observar marcações mais claras e brilhantes em regiões específicas de algumas metáfases. (Figura 3E). Estas marcações podem estar indicando a posição do centrômero nos cromossomos onde foram evidenciadas, resultado este, relatado pela primeira vez em *Melipona* de alto conteúdo de heterocromatina.

Foram identificadas duas marcações nos núcleos interfásicos da

Melipona paraensis que correspondem com as regiões organizadoras dos nucléolos (Figura 3. F).

7. DISCUSSÃO

Estudos anteriores revelaram que a maioria das espécies de *Melipona* apresenta o número de cromossomos $2n=18$ sendo este o número predominante encontrado para o gênero (revisado em ROCHA *et al.*, 2007). Dentre as espécies estudadas, apenas uma, *M. seminigra*, apresenta número cromossômico diferente, $2n=22$ (FRANCINI *et al.*, 2011). Outras duas apresentam variação no número de cromossomos, *M. quinquefasciata* (ROCHA *et al.* 2007) e *M. rufiventris* (LOPES *et al.*, 2008), porém, esta variação se refere à presença de cromossomos extras que não fazem parte do conjunto cromossômico normal. Este mesmo número ($2n=18$) foi identificado para *Melipona paraensis*, espécie avaliada no presente estudo, o que confirma a predominância de $2n=18$ no gênero *Melipona*. Não foram vistas variações no número de cromossomos de *M. paraensis* em relação a outras espécies.

Estudos citogenéticos anteriores propuseram a divisão do gênero *Melipona* em dois grupos (I e II) com base no conteúdo de heterocromatina (ROCHA & POMPOLO, 1998; 2002, LOPES *et al.*, 2008). Os dados obtidos a partir da técnica de banda C revelaram que *M. paraensis* apresenta uma elevada quantidade de heterocromatina distribuída ao longo de todo cromossomo. Desta forma, *M. paraensis* pode ser incluída no grupo II onde estão agrupadas *M. capixaba*, *M. compressipes*, *M. crinita*, *M. seminigra*, *M. captiosa*, *M. scutellaris*, *M. Rufiventris* e *M. Mondury* as quais também apresentam alto conteúdo de heterocromatina.

Com apenas uma exceção dentre as mais de 20 espécies de *Melipona* analisadas, os cromossomos das espécies do subgênero *Michmelia*, quando comparados, apresentam o mesmo padrão em relação à quantidade e distribuição da heterocromatina (ROCHA *et al.*, 2007, LOPES *et al.*, 2011). *Melipona paraensis* mostrou padrão em relação à quantidade e distribuição da heterocromatina similar ao das espécies de *Michmelia* o que era esperado já que *M. paraensis* está incluída dentro deste subgênero.

O alto conteúdo de heterocromatina nos cromossomos de *M. paraensis* evidenciado por banda C, foi confirmado quando utilizou-se coloração com DAPI.

O fluorocromo CMA₃ evidenciou nos cromossomos de *M. paraensis*, a presença de marcações nas extremidades. Essas marcações parecem estar associadas a regiões organizadoras de nucléolo como observado no gênero *Partamona* e em outras espécies da tribo Meliponini (BRITO *et al.*, 1997; BRITO, 1998; ROCHA, 2002; BRITO-RIBON *et al.*, 2005; ROCHA *et al.* 2007; LOPES *et al.* 2011, LOPES *et al.* 2012; MIRANDA A.F. 2012).

Muitos estudos citogenéticos com *Melipona* de alto conteúdo de heterocromatina já foram realizados, entretanto, em nenhum deles foi possível observar a região centromérica dos cromossomos (ROCHA & POMPOLO 1998, ROCHA 2002, ROCHA *et al.* 2002, ROCHA *et al.* 2003, LOPES *et al.* 2006, LOPES *et al.*, 2011). Ao contrário, no presente estudo, observou-se, por meio de técnicas de fluorescência (DAPI), uma marcação mais clara ou brilhante, rica em AT (adenina e timina) localizada, possivelmente, na região centromérica do cromossomo de *M. paraensis*. Este é o primeiro relato de evidenciação de possível região centromérica em cromossomos de meliponíneos com alto conteúdo de heterocromatina.

8. CONCLUSÃO

Os dados deste estudo revelaram que o gênero *Melipona* apresenta características conservadas, como o número cromossômico ($n=9$ e $2n=18$).

Considerando a divisão do gênero *Melipona* em grupo I e grupo II em estudos anteriores, ficou evidente que *Melipona paraensis* pertence ao grupo II já que apresentou alto conteúdo de heterocromatina.

O fluorocromo DAPI marcou fortemente a heterocromatina visualizada também pela banda C indicando que estas regiões devem ser ricas em pares

de base AT. Marcações claras e brilhantes, observadas por FISH, sugerem identificação de regiões centroméricas em cromossomos de *M. paraensis*.

O fluorocromo CMA₃ marcou as extremidades dos cromossomos e sugere-se que estas marcações podem estar associadas às Regiões Organizadoras de Nucléolo desta espécie.

A NORs evidenciou duas marcações fortes nos núcleos interfásicos.

AGRADECIMENTOS

Os Autores agradecem à todos que direta ou indiretamente contribuíram nesse trabalho e CAPES pela bolsa cedida a Edson Cassinela.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRITO, R. M., COSTA, M. A. & POMPOLO, S. G. 1997. Characterization and distribution of supernumerary chromosomes in 23 colonies of *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Brazilian Journal of Genetics 20: 185-188.

BRITO, R.M. 1998. Caracterização citogenética de duas espécies do gênero

Partamona Schwaz, 1939 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais,

BRITO-RIBON, R. M., POMPOLO, S.G., Martins, M.F., MAGALHÕES, M.F.M., BARROS, E.G. & SAKAMOTO-HOJE, E.T. 2005. Cytogenetic Characterization of Two *Partamona* Species (Hymenoptera, Apinae, Meliponini) by Fluorochrome Staining and Localization of 18S rDNA Clusters by FISH. *Cytologia* 70: 373-380.

FRANCINI, I. B., GROSS, M. CI., NUNES-SILVA, C. G. & CARVALHO-ZILSE, G. A. 2011. Cytogenetic analysis of the Amazon stingless bee *Melipona seminigra merrillae* reveals different chromosome number for the genus. *Scientia Agricola. (Piracicaba, Braz.)* [online]., vol.68, n.5.

HOWELL, W.M. & BLACK, D.A. 1980 Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: A 1-step method. *Experientia* 36:1014-1915.

IMAI, H.T. TAYLOR, R.W. & CROZIER, R.H. 1988. Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interacion hypothesis. *Japanese Journal of Genetics*, 63:159-185.

LOPES, D.M., FERNANDES, A., PRAÇA-PONTES, M.M., WERNECK H.A., RESENDE, H.R. & CAMPOS L.A.O. 2011. Cytogenetics of three *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Sociobiology*, 58(1): 185-194.

LOPES, D.M., FERNANDES, MIRANDA, R.V. & FERNANDES, A. 2012. Karyotype description of *Cephalotrigona femorata* Smith (Hymenoptera: Apidae) and the C-banding pattern as a specific marker for *Cephalotrigona*. *Sociobiology*.

LOPES, D.M., POMPOLO, S.G., CAMPOS, L.A.O & TAVARES, M.G. 2008. Cytogenetic characterization of *Melipona rufiventris* Lepeletier 1836 and *Melipona mondury* Smith 1863 (Hymenoptera, Apidae) by C banding and

fluorochromes staining. *Genetics and Molecular Biology* 31: 49-52.

LOPES, D.M., POMPOLO, S.G., CAMPOS, L.A.O & TAVARES, M.G. 2008. Cytogenetic characterization of *Melipona rufiventris* Lepeletier 1836 and *Melipona mondury* Smith 1863 (Hymenoptera, Apidae) by C banding and fluorochromes staining. *Genetics and Molecular Biology* 31: 49-52.

MIRANDA A.F. 2012. ESTUDOS CITOGENÉTICOS E MOLECULARES DO GÊNERO *Partamona*: FILOGENIA E CROMOSSOMO B. Dissertação (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

PINKEL, D., STRAUME, T. & GRAY, J.W. 1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 83:2934-2938.

ROCHA, M. P. & POMPOLO, S. G. 1998. Karyotypes and heterochromatin variation (C-bands) in *Meliponas* pecies (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Genetics and Molecular Biology* 21: 41-45.

ROCHA, M. P. 2002. Análises citogenéticas em abelhas do gênero *Melipona* (Hymenoptera, Meliponinae). Dissertação (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) – Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

ROCHA, M. P., CRUZ, M. P., FERNANDES, A., WALDSCHMIDT, A. M., SILVA-JUNIOR, J. C. & POMPOLO, S. G. 2003. Longitudinal differentiation in *Melipona mandacaia* (Hymenoptera, Meliponini) chromosomes. *Hereditas* 138: 133-137.

ROCHA, M. P., POMPOLO, S. G., DERGAM, J. A., FERNANDES, A., & CAMPOS, L. A. O. 2002. DNA characterization and karyotypic evolution in the bee genus *Melipona* (Hymenoptera, Meliponini). *Hereditas*, v. 136, p. 19-27.

ROCHA, M. P.; POMPOLO, S. G.; FERNANDES, A. & CAMPOS, L. A. O. 2007. *Melipona* – Seis décadas de citogenética. Bioscience Journal, Vol.23, Supplement 1, pp. 111-117, ISSN 1516- 3725.

SCHWEIZER, D. 1980. Simultaneous fluorescent staining of R bands in a specific heterochromatin regions (DA/DAPI-bands) in human chromosomes. Cytogenetics and Cell Genetics.27: 190-193.

SUMNER, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Experimental Cell Reserch. 75, 304-306.

10. LEGENDA DAS FIGURAS

Figura 1: Mapa do Estado do Pará, realçando o município de Altamira, local onde foi coletada a *Melipona paraensis*.

Figura 2. A): Cariótipo da *Melipona paraensis* ($2n = 18$) com base em coloração

convencional. Barra de escala: 5 μm

Figura 2. B): Metáfase da *Melipona paraensis*, coloração convencional(2n = 18)

convencional. Barra de escala: 5 μm

Figura 3. A): Banda C de *Melipona paraensis* ilustrando cromossomos com alto conteúdo de heterocromatina. Barra de escala: 5 μm .

Figura 3. B): Metáfases tratadas com DAPI, regiões mais claras correspondetes a marcação DAPI positiva. Barra de escala: 5 μm .

Figura 3. C) e D): Metáfases tratadas com DAPI e com CMA3. Setas indicam regiões DAPI positiva, regiões fluorescentes (brilhantes) ricas em AT (adenina e timina) e cabeças de setas indicam regiões CMA3 positiva. Barra de escala: 5 μm .

Figura 3. E): Fluorescencia DAPI. Setas indicando a regiões centroméricas. Barra de escala: 5 μm .

Figura 3. F): Banda Nors, cabeças de setas indicam 2 marcações nos núcleos interfásicos.

11. DOCUMENTOS SUPLEMENTARES

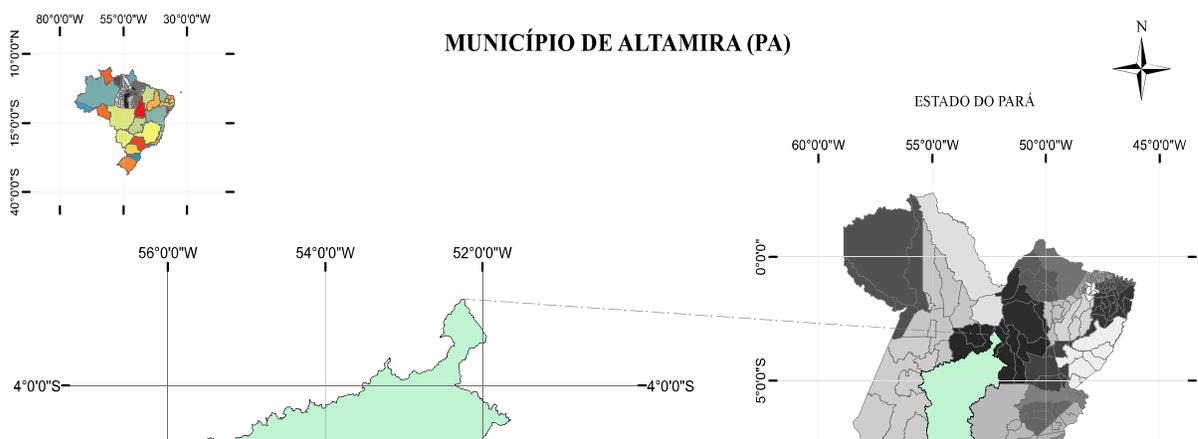


Figura 1.

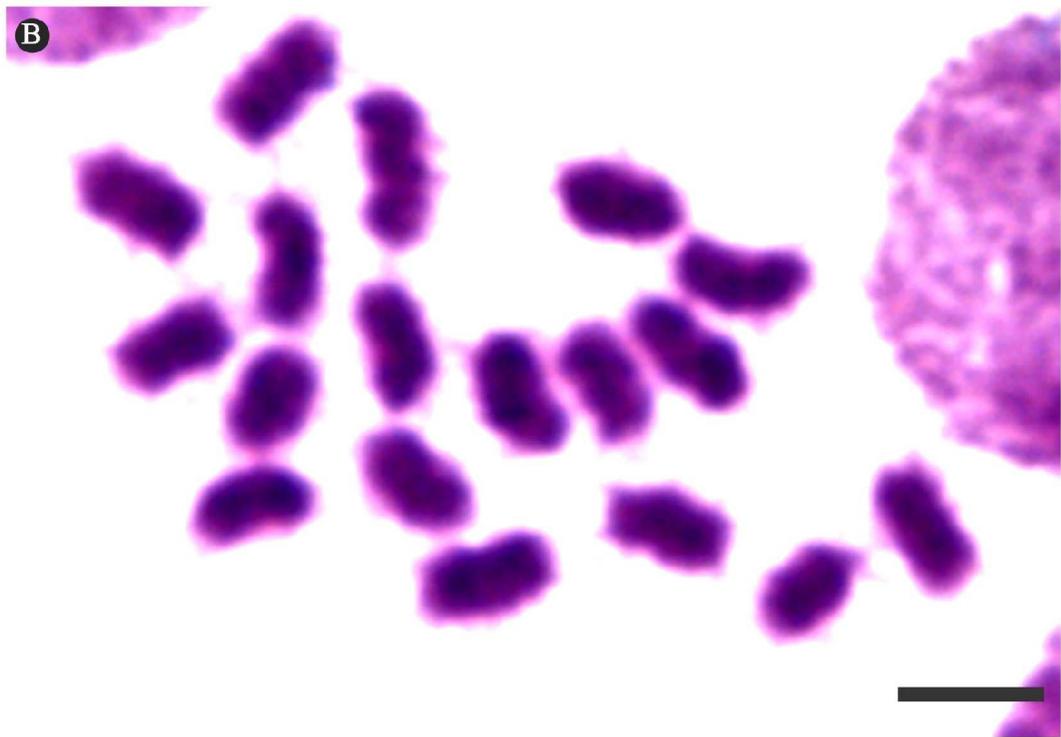
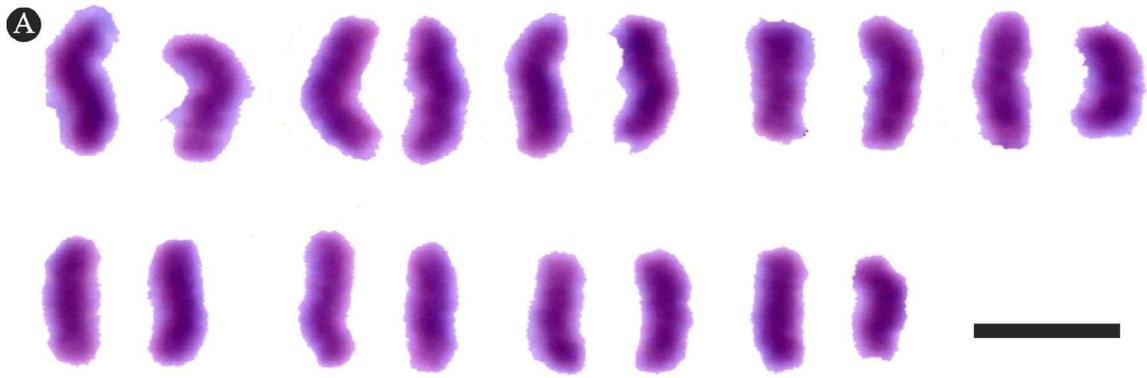


Figura 2.

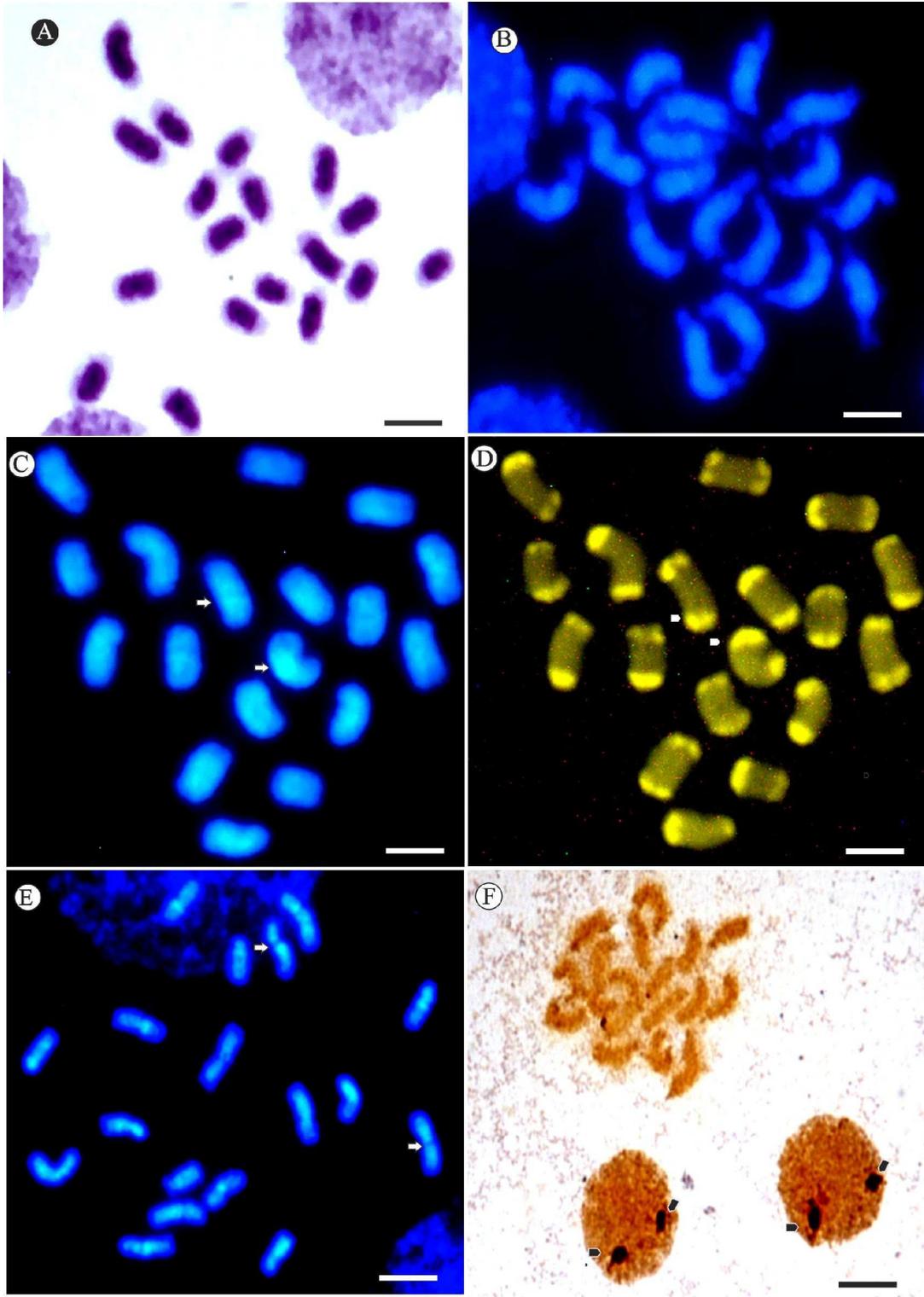


Figura 3.